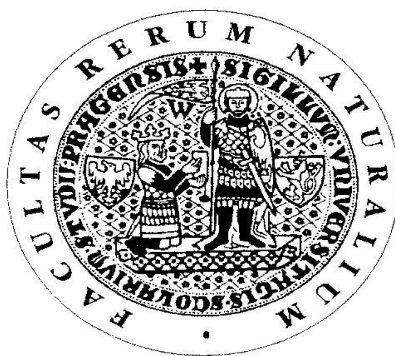


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Milan Libánský

Stanovení arbutinu na uhlíkové pastové elektrodě

Determination of arbutin using carbon paste
electrode

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2011

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63), projektem KONTAKT (AMVIS) ME 10004 a grantem SVV-2011-263204.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné použití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 11. července 2011

Rád bych poděkoval Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi CSc. a Mgr. Haně Dejmkové za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěl poděkovat všem členům katedry analytické chemie za příjemné prostředí, které mi poskytovali během mé práce v laboratoři. Děkuji také svým rodičům, kteří mi umožnili studovat vysokou školu a děkuji za jejich podporu během studia.

Klíčová slova:

Diferenční pulzní voltametrie

Uhlíková pastová elektroda

Arbutin

Kosmetika

Key words:

Differential pulse voltammetry

Carbon paste electrode

Arbutin

Cosmetics

Abstrakt:

V této bakalářské práci byly optimalizovány podmínky pro stanovení hydrochinon- β -D-glukopyranosidu (arbutinu) technikou diferenční pulzní voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě.

Ze závislosti výšky píků v závislosti na pH bylo pro stanovení zvoleno prostředí o $\text{pH} = 2$. Ve vybraném prostředí byla změřena koncentrační závislost, ze které byly určeny meze detekce a stanovitelnosti na hodnoty $0,73 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ a $2,42 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$.

Byla zkoumána možnost dále zvýšit citlivost stanovení pomocí akumulčního kroku, ale akumulace arbutinu na elektrodě nebyla pozorována ani po deseti minutách.

Vyvinutá metoda stanovení arbutinu byla ověřena stanovením této látky v reálném vzorku kosmetického krému. Byla provedena extrakce arbutinu do methanolického a vodného roztoku. Obsah analytu byl v obou těchto roztocích stanoven metodou standardního přídatku. V methanolickém roztoku byla prokázána velice dobrá opakovatelnost měření a velice dobrá shoda naměřeného výsledku koncentrace s uvedeným obsahem arbutinu v krému. U vodného roztoku byly zjištěné hodnoty koncentrací několikanásobně nižší, pravděpodobně v důsledku neúplného rozpuštění analytu.

Abstract:

This bachelor thesis concerns to the optimization of the conditions for the determination of hydroquinone- β -D-glucopyranoside (arbutin) by the differential pulse voltammetry on carbon paste electrode.

From the dependence of peak heights on the pH, buffer of pH 2 was selected as the optimum medium. In this media, concentration dependences were measured and detection limit and quantification limit of 0.73×10^{-6} mol/l and 2.42×10^{-6} mol/l, respectively, were obtained.

The possibility of further increase of the sensitivity of determination by the accumulation step was studied, but the accumulation of arbutin was not observed even after ten minutes.

The developed method for the determination of arbutin was verified by its determination in the real sample of the cosmetic cream. Results of extraction of arbutin to methanolic and aqueous solution were studied. Concentration of the analyte was determined by standard addition method.

In the case of methanolic solution, very good repeatability of the measurements and agreement of the determined and declared content of arbutin in the cream was found. In the aqueous solution much lower amount of arbutin was found, probably due to incomplete extraction of the analyte.

Obsah:

1. Teoretická část	9
1.1 Cíl práce	9
1.2 Studovaná látka	9
1.3 Způsoby stanovení arbutinu	11
1.4 Uhlíková pastová elektroda	12
2. Experimentální část	14
2.1 Použité chemikálie	14
2.2 Studovaná látka	15
2.3 Použitá aparatura	15
2.4 Další používaná zařízení	16
2.5 Pracovní postupy	16
2.5.1 Optimalizace měření	16
2.5.2 Reálné vzorky	16
2.6 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku	17
3. Výsledky a diskuze	18
3.1 Optimalizace pH prostředí	18
3.2 Ověření možnosti akumulace	20
3.3 Koncentrační závislost	21
3.4 Stanovení arbutinu v reálném vzorku	23
3.4.1 Extrakce do vodného roztoku	23
3.4.2 Extrakce do methanolického roztoku	23
3.4.3 Porovnání výsledků měření reálných vzorků	26
4. Závěr	28
5. Literatura	29

Seznam použitých zkratek:

A	absorbance
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
c_i	analytická koncentrace látky i
CPE	uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E_p	elektrický potenciál píku
I_p	elektrický proud píku
λ	vlnová délka
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MeOH	methanol
p.a.	pro analýzu
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R	korelační koeficient
t	čas
UV, VIS	ultrafialová, viditelná oblast
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (ultra performance liquid chromatography)
ESI	elektrická ionizace (electrospray ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
R_{SD}	odhad směrodatné odchylky

1. Teoretická část

1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je studium chování hydrochinon- β -D-glukopyranosidu (arbutinu), látky používané k zesvětlování kůže (skin lightening agent), vývoj metody pro její stanovení pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) a využití získaných výsledků pro stanovení arbutinu v reálném vzorku kosmetického výrobku.

1.2. Studovaná látka

Pigmentační skvrny, jako jsou jaterní skvrny, stařecké lentigo a pihy, se nejčastěji vyskytují na rukou, obličeji a zádech a jsou chápány jako vady na kráse. Evropská kultura tyto vady z jisté části přehlíží, ovšem asijské kultury nikoliv a snaží se o daleko razantnější potlačení. Jejich snaha nekončí pouze u odstranění pih atd., ale dosahuje větších rozměrů daných východní kulturou, kde je ideálem krásy světlá pleť. Proto využívají různých kosmetických přípravků k jejímu celkovému zesvětlení a podporují jejich vývoj.

Výskyt hyperaktivních melanocytů a následný vznik nadměrné pigmentace (skvrn) v lidské kůži (tzv. melanismus) patří k biochemickým změnám, ke kterým dochází v organismu během procesu stárnutí a vývoje jedince. Výskyt skvrn také podporují různé chemické prostředky a UV záření, které na člověka během života působí. ^[1]

Potlačení a zabránění vzniku těchto skvrn je možné pomocí bránění tvorby pigmentu melaninu v melanocytech, a to blokováním účinku enzymu tyrozinázy v hyperaktivních melanocytech. ^[2,3]

K blokování tvorby melaninu se v dnešním kosmeticko-farmaceutickém průmyslu používá nepřeberné množství látek a chemických sloučenin, jako jsou například arbutin, hydrochinon, rucinol a mnoho dalších látek s bělicím účinkem (kyselina retinová, glykolová a mléčná)^[4]. Ovšem s nárůstem a poptávkou po těchto kosmetických výrobcích roste i obava z možné potenciální mutagenity a nepříznivého vlivu na lidský

organismus. Většina těchto novodobých produktů je ve fázi rozsáhlého testování a zkoumání^[5].

Studovaný hydrochinon- β -D-glukopyranosid (arbutin) patří do skupiny glykosidů s navázanou hydrochinonovou skupinou (také glykosylované hydrochinony). Mnoho druhů rostlin, jako jsou medvědice lékařská, brusinka, hruška, tymián, majoránka, oregáno a v neposlední řadě několik druhů obilovin, dokáže arbutin snadno vyrábět poměrně ve vysokých koncentracích. Tyto koncentrace ovšem nejsou tak vysoké, aby při klasickém požívání či používání mohly škodit lidskému organismu^[6].

U arbutinu zatím nebyla prokázána karcinogenita či mutagenita, jež by souvisela se strukturou této látky. Skládá se ze dvou hlavních strukturních částí, tedy hydrochinonů a glykosidů. Největší potenciální nebezpečí samotného arbutinu je v hydrochinonu, který je ve vyšších dávkách považován za nefrotoxický a cytotoxický^[6], ovšem je v molekule nutný, jelikož způsobuje žádané zesvětlení kůže s nejlepšími výsledky, oproti jiným, méně toxickým látkám^[4]. Německý institut pro výzkum v Postupimi zjistil, že některé střevní bakterie mohou odštěpit navázaný hydrochinon, který následně vytváří vhodné prostředí pro vznik rakoviny tlustého střeva^[7].

Aromatická sloučenina hydrochinon vzniká oxidací fenolu. Obsahuje dvě hydroxylové skupiny, vázané na protilehlých koncích benzenového jádra, přičemž obě tyto skupiny mají slabě kyselou povahu, a proto může hydrochinon odštěpit jeden, či oba kyselé vodíky za vzniku mono- či difenolátového iontu, který je tak přístupný pro vznik vazby, v případě arbutinu je tímto způsobem vázaná glykosidická část molekuly^[8]. Ve spojení s glykosidem pozbývá hydrochinon své toxicity, jelikož je v organismu dále chemicky svazován s kyselinou glukuronovou a bez problémů vylučován z organismu jako β -glukuronid^[6]. Tímto mechanismem detoxikace je z těla savců vylučována velká část lipofilních toxických látek, které by za normálních okolností nebyly rozpustné ve vodě, ale po navázání cukerné části dojde k zvětšení rozpustnosti ve vodě a k snadnějšímu vyloučení z organismu^[9,10].

Existuje studie, která naopak zveřejňuje, že při určitých dávkách a kombinacích s jinou chemickou látkou může arbutin snižovat riziko vzniku některých druhů rakoviny^[11].

1.3. Způsoby stanovení arbutinu

Arbutin je možné stanovovat různými analytickými metodami. Mezi hlavní metody patří zejména HPLC, dále voltametrie, a ze starších metod cerimetrie^[12] (titrace hydrochinonové části molekuly v arbutinu).

V případě použití kolony s ODS-Hypersil C18, kde byla použita mobilní fáze methanol : voda : 0,1M HCl (10:89:1) a UV spektrometrická detekce, bylo dosaženo lineární kalibrační křivky v rozmezí koncentrací $1,8 \times 10^{-6}$ - 1×10^{-4} mol/l a meze detekce a stanovitelnosti $7,4 \times 10^{-8}$ a $7,4 \times 10^{-7}$ mol/l. Odhadem relativní směrodatné odchylky byl 1,1 %.^[13]

V případě použití kolony Polaris C-18 s mobilní fází methanol : voda (20:80) s UV spektrometrickým detektorem, bylo dosaženo lineární kalibrační křivky v rozmezí koncentrací $1,8 \times 10^{-5}$ – $5,8 \times 10^{-4}$ mol/l s odhadem relativní směrodatné odchylky 0,6 %. Mez detekce a stanovitelnosti nebyla uvedena.^[14]

Speciálním uspořádáním je UPLC-ESI-MS/MS, kdy je ESI detektor zapojený v tandemu s hmotnostní spektrometrií. Tato metoda a uspořádání byla vyvinuta pro kvalitativní i kvantitativní stanovení arbutinu, a to nikoliv v kosmetickém přípravku, nýbrž v listech hrušky. Před analýzou musí být listy rozmělněny, ponechány louhovat v methanolu a vyextrahované látky přečištěny na chromatografické koloně ENVITM-18.

Přečištěný roztok je vnášen na kolonu HSST3 (50 mm × 2,1 mm × 0,008 mm) do mobilní fáze methanol : voda (7:93). Mez detekce byla určena na hodnotu $1,8 \times 10^{-7}$ mol/l. Bylo dosaženo lineární kalibrační křivky v rozmezí koncentrací $3,7 \times 10^{-5}$ – $5,8 \times 10^{-4}$ mol/l.^[15]

Další používanou metodou stanovení je již zmiňovaná voltametrie. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při diferenční pulzní voltametii v prostředí BR pufru o pH = 2, při použití uhlíkové pastové elektrody ze skelného uhlíku. Oxidační pík byl nalezen na hodnotě potenciálu 0,86 V. Při sestrojení kalibrační křivky bylo dosaženo výborné linearit y i při nižších koncentracích a to s relativní směrodatnou odchylkou menší než 2 %. Mez detekce byla určena na hodnotu $1,4 \times 10^{-7}$ mol/l, což je hodnota srovnatelná s výsledky měření metodou HPLC.^[16]

Podobné výsledky, ne však tak nízkou mez detekce vykazovalo i měření pomocí cyklické voltametrie se sítotiskovou elektrodou pokrytou jílovým materiálem. Měření bylo prováděno v amoniakálním pufru o pH 10 na vtištěném uhlíkovém inkoustu v polypropylen (plocha $8 \times 2,5$ mm). Zjištěná mez detekce byla $0,2 \times 10^{-6}$ mol/l.^[17]

1.4 Uhlíková pastová elektroda

Uhlíková pastová elektroda (CPE) byla objevena v roce 1958 Ralphem N. Adamsem na univerzitě Kansas^[18]. Po několika sériích úprav byla jeho následovníkem Baldwinem představena plně funkční pastová elektroda a byl odstartován raketový vzestup jejího používání^[19].

Uhlíkové pastové elektrody jsou klasifikovány jako heterogenní uhlíkové elektrody s kapalným pojivem. Skládají se z uhlíkového prášku a kapalného pojiva naplněných do elektrodového pouzdra^[20]. Elektrodová pouzdra jsou často vyráběna z polyethylenového plastu či teflonu s vnitřním kovovým pístem (Monienův typ), díky kterému je možné po měření pastu jednoduše vytlačit a otřít před dalším měřením, čímž dojde k obnovení povrchu elektrody^[18].

Jako pastová kapalina se používá nejčastěji chemicky inertní, elektrochemicky inaktivní a málo těkavé látky, jako například minerální, silikonový a parafinový olej^[20]. Jako uhlíkový prášek se dá využít například grafit či mikročástice skelného uhlíku. Obě tyto formy uhlíku splňují základní požadavky, tedy mají stejnou velikost částic, vysokou čistotu a nízkou absorpční schopnost^[21].

Vytvořené pasty jsou stabilní a vydrží řadu týdnů bez výrazných změn vlastností. Některé typy past je nutné ponechat zhruba 12-24 hodin ustálit v důsledku následné samovolné homogenizace čerstvě připravené směsi. Pokud by nebyla směs ustálená, může se projevovat nestandardní chování elektrody a nebude schopna reprodukovat měření s dostatečnou přesností^[22].

Naplněnou elektrodu není vhodné ponechávat volně na vzduchu, mohlo by dojít k vyschnutí směsi a k jejímu popraskání. Tomu lze zabránit ponecháním elektrodového konce v destilované vodě, pokud s elektrodou delší dobu není měřeno, záleží ovšem na konkrétním typu pasty a její stabilitě^[20].

Vlastnosti uhlíkové pastové elektrody jsou srovnatelné s vlastnostmi pevných elektrod. V závislosti na pH měřeného roztoku se může její potenciálový rozsah pohybovat až v rozmezí hodnot cca -1,2 V až +1,5 V.

Mezi výhody použití CPE patří již zmiňovaná obnovitelnost povrchu elektrody. Další výhodou je možnost upravit pastu podle druhu měřeného analytu či podle rozsahu měřených potenciálů. Příkladem může být možnost impregnace grafitového prášku parafínovým voskem, kdy je po ustálení pasty možné měřit až do hodnot +1,8 V a provádět stanovení v systémech s extrémně pozitivními potenciály ($\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$).

V případě měření na CPE s trikresylfosfátem dochází ke snížení zbytkových proudů vlivem elektrochemické polarizace na povrchu elektrody, což umožňuje stanovovat stříbrné ionty na sub-ultrastopové koncentrační úrovni (10^{-12} mol/l) ^[20].

Vlastnosti elektrod jdou změnit nejen výměnou některé z jejích základních složek, ale samotnou chemickou modifikací. Podle způsobu modifikace lze hovořit o chemicky modifikovaných uhlíkových pastových elektrodách (CMCPE), o elektrodách s alternovaným povrchem (fyzikálně změněn povrch elektrody) nebo o elektrodách modifikovaných *in situ*. U CPE připravovaných přimíšením modifikující komponenty do pasty dochází k chemické změně celého objemu pasty, a proto mají tyto elektrody speciální jednoúčelové použití, obvykle jako selektivní čidla pro určitou látku nebo ion ^[20,23]. Výhodná je také modifikace, kdy se spojuje uhlíková pasta se silným elektrolytem (např. 1M H_2SO_4 , HCl). Tyto elektrody jsou označovány jako uhlíkové pastové elektrody s elektrolytickým pojivem ^[24] neboli elektroaktivní elektrody (CPEE) ^[25].

V výčtu výhod je nutné ještě zmínit, že pokud měříme v oblasti anodických potenciálů, vznikají velmi nízké zbytkové proudy, oproti elektrodám ze zlata či platiny ^[20]. Na druhé straně pokud je CPE používána v oblasti katodických potenciálů, vykazují elektrody nezanedbatelný proud a při měření vzniká rušivý signál. Tento jev je způsoben elektrodovou redukcí rozpuštěného kyslíku v pastě ^[20].

Využití CPE je velice široké. Dají se použít pro stanovení anorganických i organických látek. ^[26]

2. Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Studovaná látka: hydrochinon- β -D-glukopyranosid (arbutin, 98%, Sigma-Aldrich), obr 1.

Zásobní roztok arbutinu o koncentraci 1×10^{-3} mol/l byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v destilované vodě.

Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány pipetováním přesného objemu zásobního roztoku a jeho následného naředění na potřebnou koncentraci BR pufrem. Zásobní roztok arbutinu byl uchováván v temnu v chladničce.

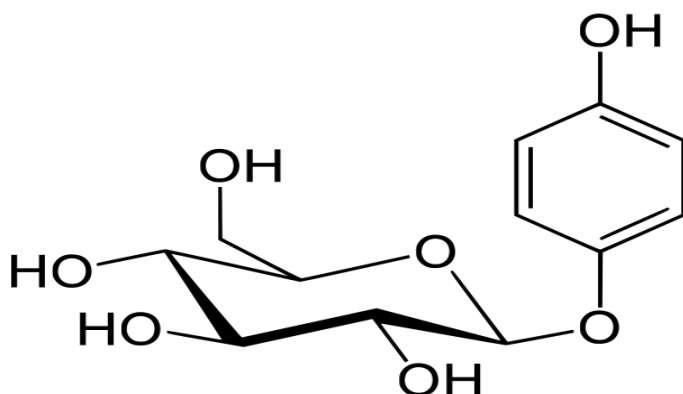
Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven smísením dvou základních roztoků.

Prvním základním roztokem byl vodný roztok hydroxidu sodného (p.a., Penta, Česká republika) o koncentraci 0,2 mol/l. Druhým základním roztokem byl směsný roztok připravený kombinací kyseliny fosforečné (85%, $\rho = 1,71$ g/ml, Lachema, Česká republika), kyseliny borité (p.a., Lachema, Česká republika) a kyseliny octové (99%, $\rho = 1,06$ g/ml, Lach-Ner, Česká republika), každá o koncentraci 0,04 mol/l.

Při rozpouštění vzorků krému byl použit methanol (p.a., Merck, Německo).

Uhlíková pasta pro plnění elektrody byla připravena rozetřením 0,25 g grafitu CR-2 (Grafit Týn, Česká republika) s 0,1 ml minerálního oleje (Fluka Biochemika, Švýcarsko).

2.2 Studovaná látka



Obr. 1

Strukturní vzorec arbutinu

C.A.S. name: hydroquinone- β -D-glucopyranoside

C.A.S. number: 497-76-7

Sumární vzorec: $C_{12}H_{16}O_7$

Molární hmotnost: 272,25 g/mol

Bod tání: 468 K (195 °C)

Fyzikální stav: bílý jemný prášek

Další používaná jména: arbutin, ursil, uvasol

2.3 Použitá aparatura

Pro voltametrická měření byla použita tato aparatura:

Přístroj:

Eco Tribo polarograf, Software Polar Pro v. 5.1 (Polaro-Sensors, spol.s.r.o., Praha)

Elektrody:

Pracovní: uhlíková pastová elektroda s teflonovým pouzdem, aktivní plocha 2 mm

Referentní: argentchloridová elektroda s 3 mol/l KCl (ECO-Trend, Česká republika)

Pomocná: platinová plíšková elektroda (ECO-Trend, Česká republika)

2.4 Další používaná zařízení

pH metr: Jenway 3510 (Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou

Spektrofotometr: Agilent 8453 (Agilent, USA)

2.5 Pracovní postupy

2.5.1 Optimalizace měření

Vzorek pro voltametrická měření byl připravován odpipetováním potřebného objemu základního roztoku arbutinu do 10ml odměrné baňky a doplněním po rysku BR puřem, promícháním a převedením do voltametrické nádoby.

Všechna měření byla třikrát opakována a prováděna za laboratorní teploty.

Nastavení parametrů pro DPV bylo následovné: rychlost polarizace 20 mV/s, výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 100 ms. Křivky byly měřeny v potenciálovém rozsahu 0 až 1200 mV.

Při měření kalibrační závislosti arbutinu byly hodnoty zpracovány metodou lineární regrese a meze detekce a stanovitelnosti byly stanoveny jako trojnásobek a desetinásobek poměru směrodatné odchylky nejnižšího změřitelného signálu (rozlišitelného od šumu) k směrnici kalibrační křivky.

2.5.2 Reálné vzorky

Jako reálný vzorek byl použit nejrozšířenější kosmetický produkt obsahující arbutin, Unitone 4 α -arbutin (Isis Pharma, USA) o obsahu 2 % účinné látky.

Vzorky byly pro měření připraveny sonifikací 0,1 g krému v 10 ml destilované vody nebo methanolu (MeOH). V methanolu proběhlo úplně rozpuštění po protřepání. Ve vodě nedošlo k úplnému rozpuštění ani po použití ultrazvuku. Z těchto vzorků bylo následně odebráno 0,5 ml do 10ml odměrné baňky a doplněno po rysku BR puřem o pH 2. Z odměrné baňky byl roztok převeden do voltametrické nádoby pro měření.

2.6 Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku

Stálost zásobního roztoku arbutinu ($c = 1 \times 10^{-3}$ mol/l) byla studována spektrofotometricky. Absorpční spektrum studované látky rozpuštěné v destilované vodě bylo sledováno v rozmezí vlnových délek 200-700 nm, obr. 2.

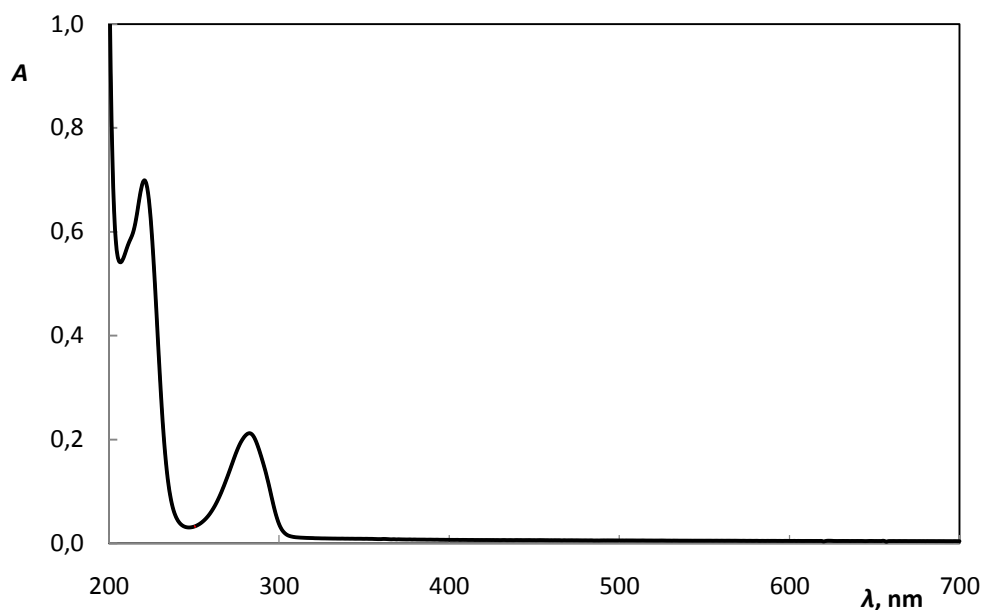
Absorbance byla sledována v kompletním rozsahu křivky po dobu 6 měsíců. Změřené spektrum je znázorněno na obr. 3.

Z průběhu jednotlivých křivek vyplývá, že zásobní roztok je stabilní při uchovávání v temnu a chladu minimálně po dobu 6 měsíců.

Tab. I

Naměřené hodnoty absorbancí zásobního roztoku arbutinu:

t dny	A ($\lambda = 218$ nm)	A ($\lambda = 283$ nm)
1	0,624	0,187
30	0,666	0,212
180	0,666	0,212



Obr. 2

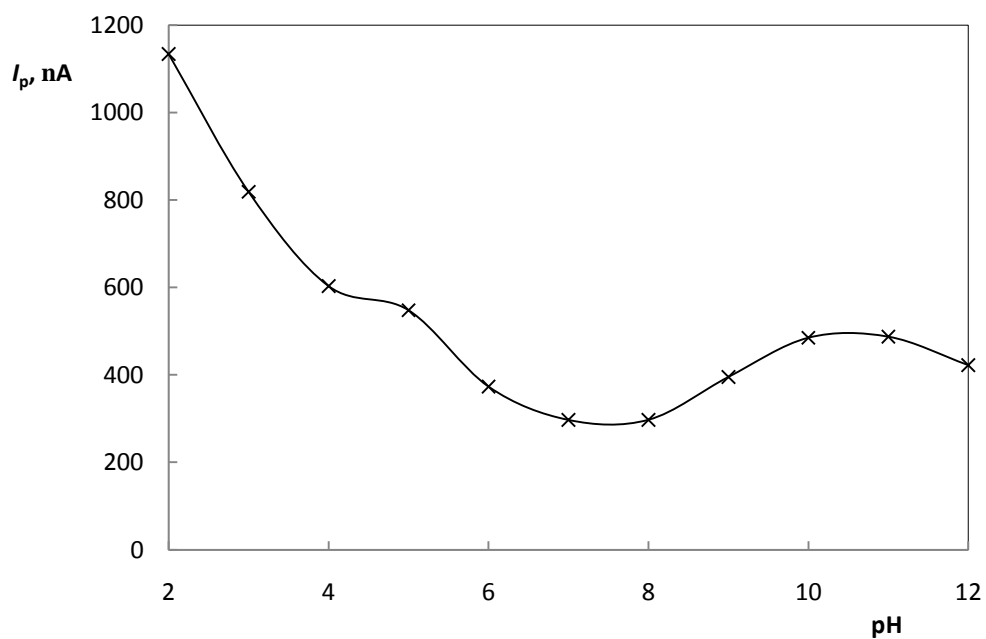
UV-VIS spektrum 1×10^{-3} mol/l roztoku arbutinu v destilované vodě, měřeno v 1mm křemenné kyvetě proti destilované vodě.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace pH prostředí

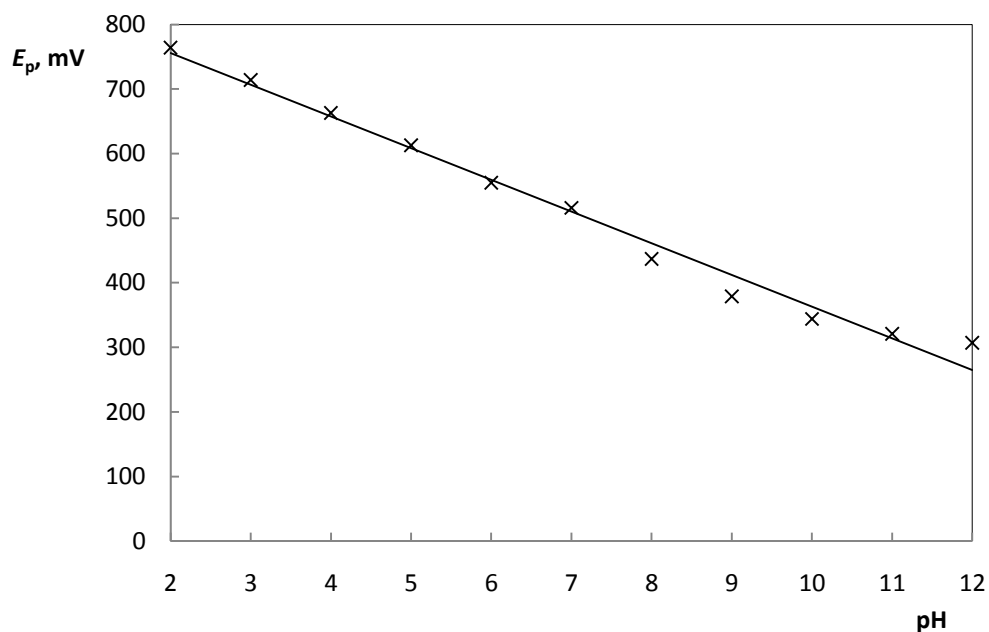
Vliv pH na chování arbutinu při DPV byl sledován v prostředí BR pufru o hodnotě pH 2 až 12. Koncentrace zásobního roztoku byla 1×10^{-4} mol/l.

Naměřené hodnoty závislosti proudu (I) a potenciálu (E) na pH jsou ukázány na obr. 3 a obr. 4. Naměřené voltamogramy jsou zobrazené na obr. 5.



Obr. 3

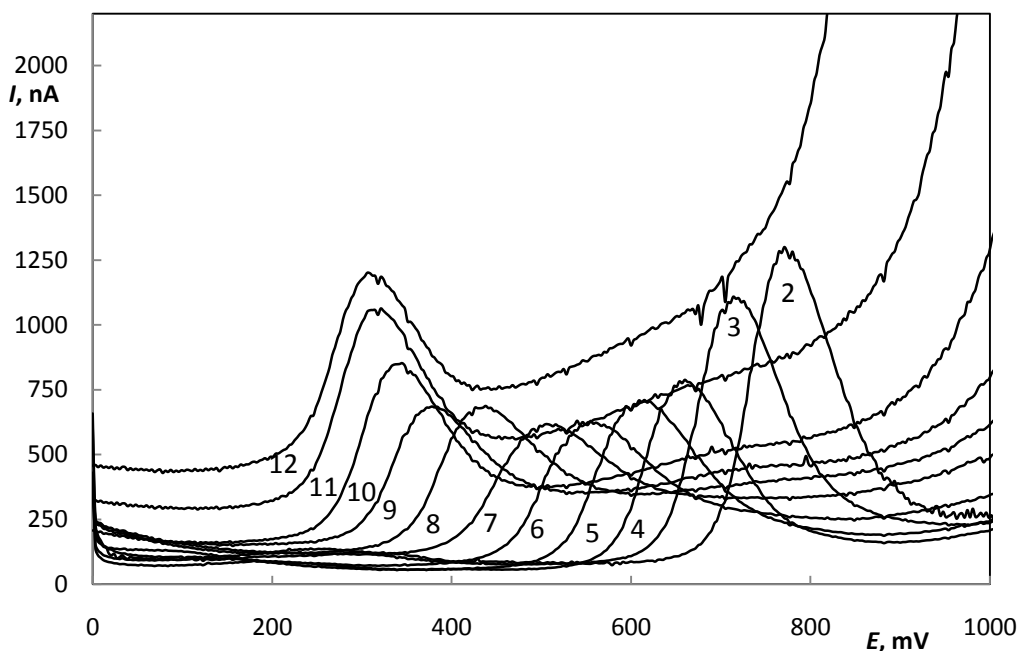
Graf závislosti velikosti proudu píku 1×10^{-4} mol/l roztoku arbutinu na pH prostředí.



Obr. 4

Graf závislosti potenciálu píku 1×10^{-4} mol/l roztoku arbutinu na pH prostředí.

Jak bylo zjištěné, arbutin poskytuje při všech měřených pH dobře vyvinutý pík, jehož poloha se se zvyšujícím pH prostředí posouvá směrem k nižším hodnotám potenciálů. Výška píku se naopak snižuje k neutrálním hodnotám pH. V zásaditějším prostředí se zvedá hodnota proudu pozadí a velikost šumu. Po spojení předešlých zjištění bylo jako optimální prostředí pro měření zvoleno pH 2.



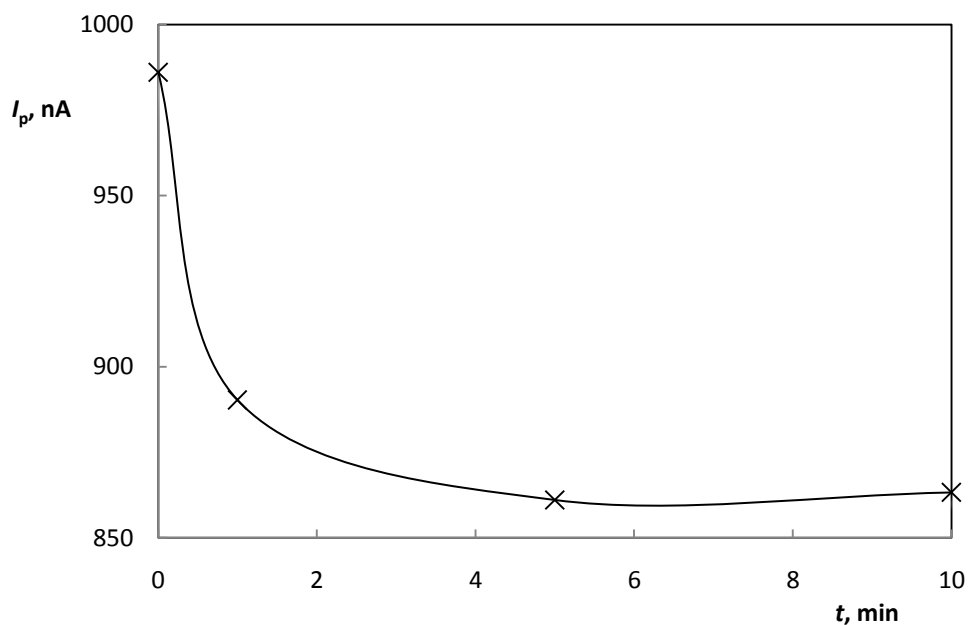
Obr. 5

Voltamogramy arbutinu o koncentraci 1×10^{-4} mol/l. Měřeno v prostředí BR pufru o pH odpovídajícím číslu křivky.

3.2 Ověření možnosti akumulace

Byla zkoumána možnost zvýšit citlivost stanovení pomocí akumulčního kroku. Měření byla prováděna v míchaném roztoku arbutinu o koncentraci 1×10^{-4} a 5×10^{-6} mol/l ve zvoleném prostředí o pH 2 v čase 1, 5 a 10 minut. U koncentrace 1×10^{-4} mol/l byly hodnoty proudů nejvyšší při okamžitém proměření roztoku bez akumulace a při zařazení akumulčního kroku hodnoty proudu klesly (zřejmě z důvodu možné pasivace) a při různých akumulčních časech zůstaly konstantní v rozmezí ± 30 nA. Naměřené hodnoty proudu v závislosti na čase jsou vyneseny na obr. 6. U koncentrace 5×10^{-6} mol/l byly hodnoty proudu konstantní, nezávisle na době akumulace. Hodnoty výšky píku se pohybovaly v rozmezí ± 15 nA.

K akumulaci arbutinu na uhlíkové pastové elektrodě nedochází ani po deseti minutách, a proto nebyl akumulční krok při dalších měřeních zařazen.



Obr. 6

Graf závislosti naměřeného proudu píku 1×10^{-4} mol/l roztoku arbutinu na době akumulace. Měřeno v prostředí BR pufru o pH 2 na CPE.

3.3 Koncentrační závislost

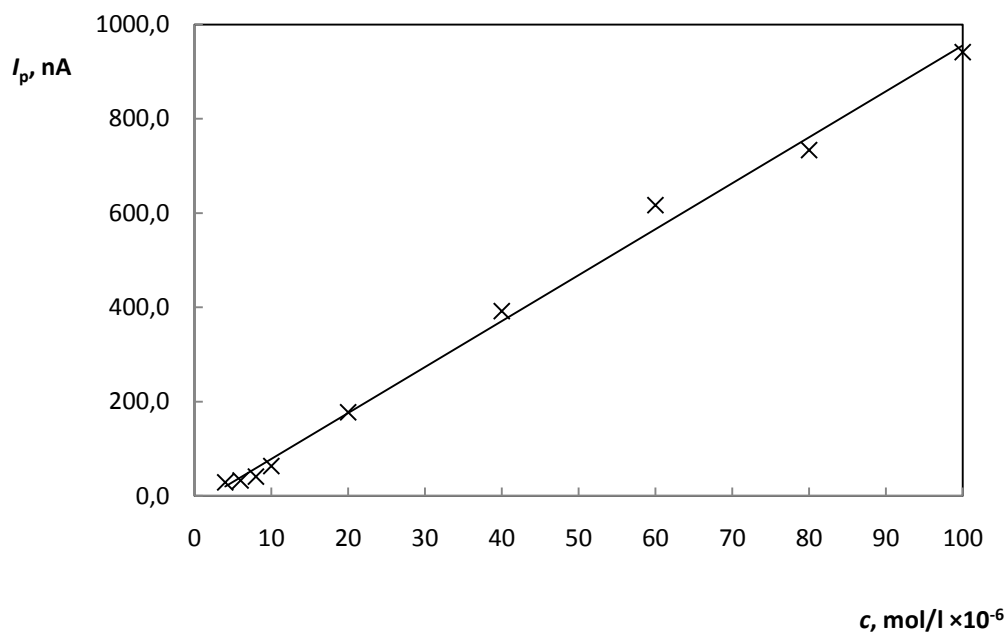
Koncentrační závislosti arbutinu byly proměřeny v rozsahu 1×10^{-4} až 4×10^{-6} mol/l v prostředí BR pufru o pH 2. Na obr. 7 je uvedena kalibrační přímka v celém měřeném rozsahu. Voltamogramy v koncentračním rozmezí 1×10^{-4} až 4×10^{-6} mol/l jsou zachyceny na obr. 8 a obr. 9. Parametry kalibrační přímky pro stanovení arbutinu pomocí DPV jsou uvedeny v tab. II.

Závislost je v měřeném rozsahu lineární. Hodnoty dosažených mezí detekce ($\text{LOD} = 0,73 \times 10^{-6}$ mol/l) a stanovitelnosti ($\text{LOQ} = 2,42 \times 10^{-6}$ mol/l) jsou ve srovnání s předchozími voltametrickými měřeními zhruba o jeden řád vyšší.

Tab. II

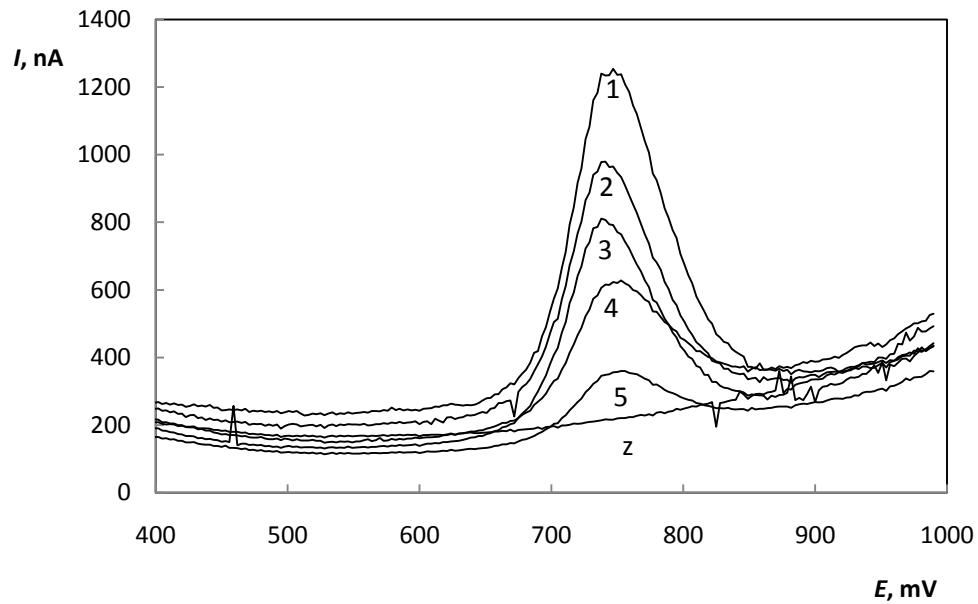
Naměřené hodnoty proudů v závislosti na koncentraci roztoku arbutinu

c mol/l	Směrnice mA×l/mol	Úsek nA	R^2	LOD μmol/l	LOQ μmol/l
1×10^{-4} - 4×10^{-6}	9,7	-19	0,9952	0,73	2,42



Obr. 7

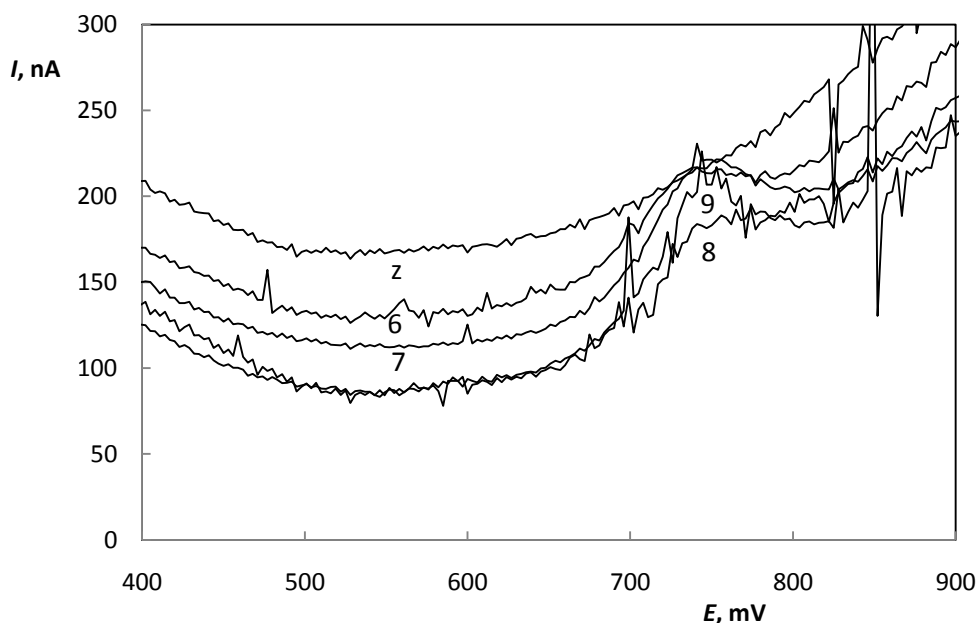
Graf kalibrační závislosti proudu píku na koncentraci zásobního roztoku arbutinu v prostředí o pH 2.



Obr. 8

Voltamogramy arbutinu měřené metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 2.

Koncentrace (1) 1×10^{-4} , (2) 8×10^{-5} , (3) 6×10^{-5} , (4) 4×10^{-5} , (5) 2×10^{-5} mol/l, (z) Základní elektrolyt.



Obr. 9

Voltamogramy arbutinu měřené metodou DPV v prostředí BR pufru o pH 2.

Koncentrace (6) 1×10^{-5} , (7) 8×10^{-6} , (8) 6×10^{-6} , (9) 4×10^{-6} , (z) základní elektrolyt.

3.4 Stanovení arbutinu v reálném vzorku

Možnost využití vyvinuté metody byla testována na reálném vzorku kosmetického krému s obsahem 2 % arbutinu. Bylo měřeno pomocí DPV v BR pufru o pH 2 bez akumulčního kroku.

3.4.1 Extrakce do vodného roztoku

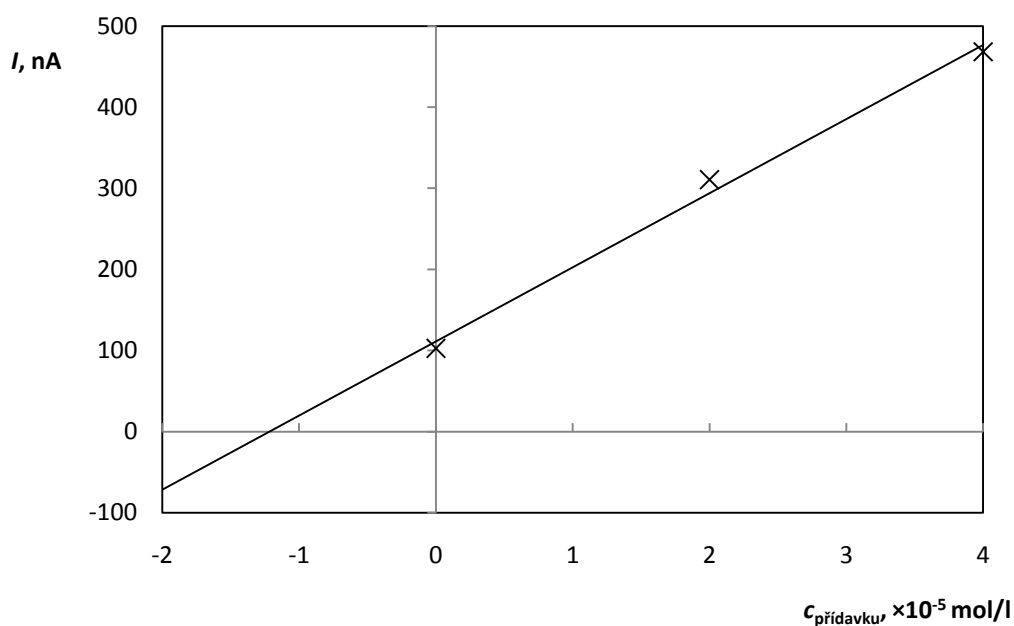
Modelový vzorek byl připraven přesným odvážením 0,1 g krému, který byl následně převeden do 10 ml destilované vody, protřepáván a následně sonifikován. Nedošlo k úplnému rozpuštění ani po sonifikaci probíhající 10 minut. Z tohoto roztoku bylo následně odebráno 0,5 ml, převedeno do 10ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Vzniklý roztok byl poté převeden do voltametrické nádoby a proměřen v sérii měření samostatně a postupně s dvěma přídávky standardního roztoku arbutinu o objemu 0,2 ml a koncentraci 1×10^{-3} mol/l. Naměřené hodnoty proudů v závislosti na

koncentraci přidaného standardu byly vždy přepočítány na jednotný objem a jsou uvedeny v tab. III. Vybraná série měření je zobrazena na obr. 10.

Tab. III

Číslo měření	I_0 nA	I_1 nA	I_2 nA
1	102	310	468
2	82	279	425
3	102	314	513

(I_0 – bez přídavku, I_1 – první přídavek, I_2 – druhý přídavek)



Obr. 10

Graf závislosti proudu píku arbutinu na koncentraci standardního přídavku vodného roztoku arbutinu o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ v prostředí BR pufru o pH 2.

3.4.2 Extrakce do methanolického roztoku

Modelový vzorek byl připraven přesným odvážením 0,1 g krému, který byl následně převeden do 10 ml MeOH a protřepáván do úplného rozpuštění. Z tohoto roztoku bylo následně odebráno 0,5 ml, převeden do 10ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Vzniklý roztok byl poté převeden do voltametrické nádoby a proměřen

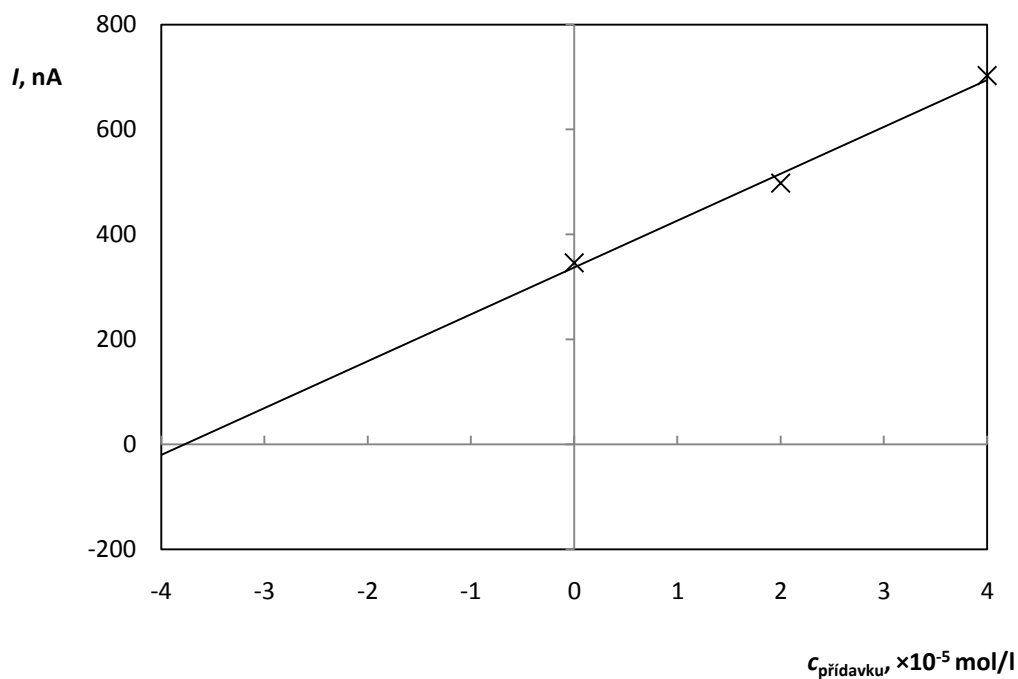
v sérii měření samostatně a postupně s dvěma přídávky standardního roztoku arbutinu o objemu 0,2 ml a koncentraci 1×10^{-3} mol/l.

Naměřené hodnoty proudů v závislosti na koncentraci přidaného standardu byly vždy přepočítány na jednotný objem a jsou uvedeny v tab. IV. Vybraná série měření je zobrazena na obr. 11.

Tab. IV

Číslo měření	I_0 nA	I_1 nA	I_2 nA
1	343	516	704
2	328	504	673
3	346	498	703

(I_0 – bez přídatku, I_1 – první přídavek, I_2 – druhý přídavek)



Obr. 11

Graf závislosti proudu píku arbutinu na koncentraci standardního přídatku arbutinu do methanolického roztoku o koncentraci 1×10^{-3} mol/l v prostředí BR pufru o pH 2.

3.4.3 Porovnání výsledků měření reálných vzorků

Statistické vyhodnocení pro sérii měření vodného a methanolického roztoku extraktu arbutinu jsou uvedené v tab. V, tab. VI a tab. VII, společně s jejich hodnotami regresních rovnic.

Koncentrace měřených roztoků (methanolického i vodného) po extrakci měla dosahovat hodnoty 37 $\mu\text{mol/l}$, což odpovídá 2% obsahu arbutinu v měřeném kosmetickém přípravku. K této hodnotě se přiblížil roztok po extrakci methanolem, a to s 98,9% shodou. Ve vodném roztoku byl naměřen pouze 33% obsah arbutinu. Extrakce do methanolu je díky nízkému rozptylu hodnot přesnější, než extrakce do vodného roztoku, což dokazuje i nižší hodnota odhadu směrodatné odchylky. Zároveň je methanolická extrakce jednodušší v provedení, jelikož není nutné roztok sonifikovat a k extrakci dojde pouhým třepáním.

Tab. V

Statistické vyhodnocení pro vodný roztok extrahovaného arbutinu z kosmetického krému.

Číslo měření	Směrnice $\text{mA} \times \text{l/mol}$	Úsek nA	R^2	c mol/l
1	9,0	111	0,9938	$1,24 \times 10^{-5}$
2	8,0	91	0,9938	$1,13 \times 10^{-5}$
3	10,0	104	0,9837	$1,04 \times 10^{-5}$

Tab. VI

Statistické vyhodnocení pro methanolický roztok extrahovaného arbutinu z kosmetického krému.

Číslo měření	Směrnice $\text{mA} \times \text{l/mol}$	Úsek nA	R^2	c mol/l
1	9,0	341	0,9929	$3,78 \times 10^{-5}$
2	9,0	329	0,9929	$3,66 \times 10^{-5}$
3	9,0	337	0,9928	$3,74 \times 10^{-5}$

Tab. VII

Porovnání statistického vyhodnocení pro vodný a methanolický roztok extrahovaného arbutinu z kosmetického krému.

Roztok	x_c $\mu\text{mol/l}$	S_r $\mu\text{mol/l}$	R_{SD} %	$L_{1,2}$ $\mu\text{mol/l}$	$c_{skut.}$ $\mu\text{mol/l}$
Vodný	11,3	1,18	10,4	2,6	37
Methanolický	37,4	0,89	2,4	1,96	37

(x_c = průměrná hodnota koncentrace, $c_{skut.}$ = koncentrace roztoku podle deklarovaného obsahu arbutinu)

4. Závěr

Bylo prostudováno voltametrické chování hydrochinon- β -D-glukopyranosidu (arbutinu) na uhlíkové pastové elektrodě, které zahrnovalo rozklad látky v čase, pH závislosti, možnost akumulace na elektrodě a proměření kalibrační křivky za optimálních podmínek se stanovením mezí detekce a stanovitelnosti.

O roztoku arbutinu bylo voltametrickým měřením zjištěno, že optimální prostředí pro měření reálných vzorků je v pufru o pH 2, kdy arbutin poskytuje nejlépe vyvinutý pík.

Ukázalo se, že není možné zvýšit citlivost pomocí akumulačního kroku ani při akumulačním času deset minut.

Byla proměřena kalibrační křivka v rozmezí koncentrací 1×10^{-4} až 4×10^{-6} mol/l a bylo dosaženo meze detekce $0,73 \times 10^{-6}$ mol/l a meze stanovitelnosti $2,42 \times 10^{-6}$ mol/l.

Použití nově vypracované voltametrické metody stanovení hydrochinon- β -D-glukopyranosidu na uhlíkové pastové elektrodě bylo ověřeno na reálných vzorcích kosmetického krému Unitone 4 α -arbutin o obsahu 2 % účinné látky. Obsah analytu byl stanovován v methanolickém a vodném roztoku. V methanolickém roztoku byla prokázána velice dobrá opakovatelnost měření a až 98,9% shoda naměřeného výsledku koncentrace s uvedeným obsahem sledované látky v krému. U vodného roztoku se naměřené hodnoty koncentrací neshodovaly, pravděpodobně v důsledku neúplného rozpuštění analytu ve vodném prostředí. Je patrné, že neúplné rozpuštění organické části analytu nedovolí plnou extrakci arbutinu ve vodě a účinek extrakce je potlačen, oproti extrakci methanolem.

Vzhledem k dobré opakovatelnosti výsledků je možné tuto nově vypracovanou metodu aplikovat na stanovení arbutinu v kosmetických přípravcích s velkým budoucím potenciálem pro získání správných a přesných výsledků.

Literatura - citace:

- [1] Agar N., Young A.R.: Melanogenesis: A photoprotective response to DNA damage? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 571, 121–132 (2005).
- [2] Sugimoto K., Nomura K., Nishimura T.: Syntheses of Alpha-Arbutin-Glycosides and Their Inhibitory Effects on Human Tyrosinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 272–276 (2005).
- [3] Sasaki M.: Whitening effects of the phenolic derivatives. *Fragrance Journal* 36, 33-36 (2009). CAN 149:408895
- [4] Funasaka Y.: Action mechanism and effects of whitening agents. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* 120, 2828-2831 (2010). CAN 154:216602
- [5] Parvez, Shoukat, Kang, Moonkyu, Chung, Hwan-Suck, Cho, Chongwoon, Hong, Moo-Chang; Shin: Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research* 20, 921-934 (2006). CAN 146:197425
- [6] Novak J.: Arbutin - A risk substance in herbs? *Zeitschrift fuer Arznei & Gewuerzpflanzen* 15, 170-173 (2010). CAN 154:282534
- [7] *Arbutin - Supporting Nomination for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program* [pdf] → <http://ntp.niehs.nih.gov/files/Arbutin.pdf> (Staženo 06.07.2011).
- [8] Hudnall P.M.: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Hydroquinone*. Wiley-VCH 2002.
- [9] Sofrová D. a kol.: *Biochemie – základní kurz*. Praha, Karolinum 2009.
- [10] Brito-Arias, M.: *Synthesis and Characterization of Glycosides*. Mexico, Springer 2007.
- [11] O'Donoghue J.L.: Hydroquinone and its analogues in dermatology – a risk - benefit viewpoint. *Journal of Cosmetic Dermatology* 5, 196-203 (2006).
- [12] Keller E.: Cerimetric determination of arbutin. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* (1959). CAN 54:133638
- [13] Thongchai, Wisanu; Liawruangrath, Boonsom; Liawruangrath, Saisunee: High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy. *Journal of Cosmetic Science* 58, 35-44 (2007). CAN 146:467857

- [14] Zhang T., Li X., Xiangya Hospital, Zhongnan University: Determination of arbutin in arbutin gel by HPLC. *Guangdong Yaoxueyuan Xuebao* 20, 635-636 (2004). CAN 144:338358
- [15] Jie Z., Qiang H., Xiang-hong K., Jian-hua L., Ai-shan Y., Bing-hua Y.: Quantitative and qualitative determination of arbutin in pear leaves by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction. *Fenxi Shiyanshi* 30, 58-60 (2011). CAN 155:282735
- [16] Liu X., Wang Q., Gao H.: Voltammetric determination of arbutin in cosmetics. *Huaxue Fence* 44, 209-211 (2008). CAN 150:175733
- [17] Ying S., Jyh-Myng Z.: An electrochemical sensor based on a clay-coated screen-printed electrode for the determination of arbutin. *Analytica Chimica Acta* 412, 63–68 (2000).
- [18] Adams, R.N.: Carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry* 30, 1576-1578 (1958).
- [19] Vytrās K., Švancara I., Metelka R.: Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *Journal of Serbian Chemical Society* 74, 1021–1033 (2009).
- [20] Švancara I., Vytrās K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* 88, 138-146 (1994).
- [21] Švancara I., Schachl. K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* 93, 490-499 (1999).
- [22] Hvízdalová M.: Magisterská práce, Univerzita Pardubice, Pardubice (1994).
- [23] Kalcher K.: Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. *Electroanalysis* 2, 419-433 (1990).
- [24] Bauer D., Gaillochet H.: Behavior of carbon pastes containing an electroactive compound. *Electrochimica Acta* 19, 597-606 (1974).
- [25] Brainina Kh. Z., Vydrevich M.B.: Stripping analysis of solids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 121, 1-28 (1981).
- [26] Kuwana T., French W.G.: Electrooxidation or reduction of organic compounds into aqueous solution using carbon paste electrode. *Analytical Chemistry* 36, 241-242 (1964).